

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590142

研究課題名(和文) 特異的アミノ酸残基を指向した新規ビタミンD受容体リガンドの設計と合成

研究課題名(英文) Design and synthesis of novel vitamin D receptor ligands having a functional group that reinforces the interaction with the receptor

研究代表者

藤島 利江 (Fujishima, Toshie)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：90286980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：受容体に存在する重要なアミノ酸残基を目指した構造修飾として、リガンド結合領域に存在する唯一のアルギニン残基を志向する官能基であるカルボキシ基またはそのバイオイソスターを導入したビタミンD誘導体を設計した。さらに、異なるアミノ酸残基をターゲットとして、A環部へのスピロオキセタン構造の導入を試みた。A環前駆体の効率よい合成法確立を目指し、収束的方法にて合成が完了した。新規VDRリガンドの結合能は側鎖末端官能基の種類に応じ、炭素数への依存性が観測された。2位スピロオキセタン誘導体は、1位においても親和性が保持されたことから、オキセタンが1位ヒドロキシ基の代替としてはたらくことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Novel vitamin D receptor (VDR) ligands having a functional group designed to reinforce the interaction to the VDR through a certain amino acid residue were synthesized. The ligands having a carboxy group in the A-ring of vitamin D instead of the important 1 α -hydroxy group were synthesized by a convergent method using palladium catalyst. In addition, vitamin D analogues having a spiro-oxetane fused at the C2 position in the A-ring were also synthesized. The VDR binding of the synthesized compounds revealed that the introduction of a carboxy group or an oxetane into the C2 position of the A-ring would compensate the loss of the 1 α -hydroxy group to a certain extent to generate unique vitamin D analogues.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ビタミン ホルモン 核内受容体 ステロイド 化学合成

1. 研究開始当初の背景

核内受容体スーパーファミリーに属するビタミンD受容体(VDR)は、ビタミンDおよびその代謝物の分子標的である。ビタミンD₃は複数の酵素によって代謝活性化を受け、古典的には、カルシウムホメオスタシスを担う小分子として機能する。近年、骨が体軸を保持する物理的役割のみならず、例えば、免疫を担当する臓器としても注目を浴びており、骨に作用する重要なホルモンとしてビタミンD₃代謝物群の機能解明が望まれている。ビタミンD₃はコレステロールより生合成されるホルモンであり、7-デヒドロコレステロールの光開環反応・熱異性化反応が特徴的なトリエン部を有するセコステロイドを生む。主に肝臓に存在するCYP27A1により側鎖部25位水酸化を受けて25-ヒドロキシビタミンD₃(1)を経由し、活性型ビタミンD₃、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(2)が生成する。血清中に最も多く存在する代謝物は25-ヒドロキシビタミンD₃(1)であり、ホルモンである1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(2)は(1)の1/1000の濃度しか存在しない。

ビタミンDの多様な作用を利用すべく、これまで多くの誘導体が設計・合成されてきた。ビタミンDは柔軟性の高い分子であることから「配座固定」、また、側鎖部のさらなる水酸化が作用を減弱させることから「代謝不活性化阻止」等をキーワードとして、成功した側鎖部アナログがいくつか存在する。一方、6員環A環部アナログも当研究代表者らのアプローチを含め、様々な誘導体の合成に成功しているが、その例は限られていた。

リガンド-受容体複合体のX線結晶解析の結果によって、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(2)の3つのヒドロキシ基がそれぞれ2つのアミノ酸残基により認識され、水素結合を形成することが示された。A環1位ヒドロキシ基はVDRリガンド結合部位に存在するアルギニン残基(Arg-274)を指向する。アルギニンはタンパクを形成するアミノ酸のうちでも存在比の低いことが知られるが、VDRリガンド結合深部に存在するのはArg-274のみである。ヒトVDRにおいてこのArg-274がLeuに変異した例が知られており(HVDRR: hereditary vitamin D resistant rickets)、この変異VDRが1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(2)を認識するには、通常の1000倍以上の濃度が必要とされる。したがって、生理学的濃度の1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(2)では変異VDRに認識されないため、ホルモンはその役割を果たせず、重篤な病をもたらす。以上のことから、低分子リガンドである1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(2)の1位水酸基と、高分子受容体のリガンド結合部位に存在するアルギニン残基(Arg-274)の相互作用がリガンド認識に最も重要と考えられた。

2. 研究の目的

天然ホルモンである1,25-ジヒドロキシビタミンD₃(2)はA環上に2つのヒドロキシ基を有する。3位ヒドロキシ基欠損は(2)の1/8の親和性となるに過ぎない一方で、1位ヒドロキシ基欠損は(2)の1/1000の親和性となることから、1位はVDRのリガンド認識において大きな役割を果たしていることが予測できる。この1位ヒドロキシ基を認識するのが、VDRリガンド結合領域(LBD)深部に存在する唯一のアルギニン残基であるArg-274であることに着目し、ヒドロキシ基よりもアルギニン残基と強い相互作用を持つと考えられる官能基を導入した新規VDRリガンドを設計し、その効率よい合成法の確立を目指す。

さらに、VDRが認識するビタミンD誘導体のA環部付近は親水の空間で占められており、天然ホルモン(2)と受容体との複合体形成には利用されていないアミノ酸残基が存在する。そこで、特定のアミノ酸残基を目指したリガンド設計として、カルボニル等価体であるオキセタン構造をA環部に導入したリガンドを設計し、その特徴的な構造を活かした合成を行うこととした。

3. 研究の方法

新規VDRリガンドの合成は、鎖状のA環部前駆体と別途合成したCD環部とをパラジウム触媒を用いて連結するTrostらが発表した収束的方法を用いることとした。したがって、本研究では特徴的官能基を望みの位置に有するA環部エンイン体の合成法確立が当面の課題であった。

まずは、アルギニン残基との強い相互作用が可能と考えられるカルボキシ基をA環部2位に導入した化合物を設計し、そのA環部前駆体合成を試みた。3-buten-1-olを出発原料とし、3位に相当するヒドロキシ基をシャープレスAD反応にて導入後、末端にアルキンを有する-ヒドロキシエステル誘導体へと導いた。この3位ヒドロキシ基を足掛かりに、2等量の塩基処理により得たエステルエノラートアニオンに対し、臭化アリルを導入し、目的の2位に官能基を有するエンイン構造に変換した。さらに、2位アルキル側鎖を伸長することにより、様々な側鎖長の誘導体の合成が可能となった。

次に、A環部にオキセタンを有する誘導体は、まず2位にスピロオキセタン構造を導入すべく、ペンタエリスリトールを原料として合成を開始した。4つのヒドロキシ基のうち1つをPMB基にて保護し、残る1つに脱離基導入後、塩基処理することにより、四員環エーテルであるオキセタンを構築した。その後、エチニル基、及びビニル基を導入することにより、目的のエンイン構造へと導いた。1位、及び3位ヒドロキシ基に関する相対配置が

anti 体と *syn* 体である 2 種を合成し、CD 環部との連結後に分離精製し、絶対配置を改良モッシャー法により決定した。結果、A 環上のヒドロキシ基に関する可能な全ての立体異性体 4 種の合成が完了した。

合成した新規 VDR リガンドは、逆相リサイクル高速液体クロマトグラフィーにて分離精製し、ウシ胸腺 VDR を用いた結合能試験に付した。ウシ胸腺 VDR のリガンド結合領域はヒト VDR の LBD と相同性が高く、機能的にほぼ一致することが知られている。これまでに研究代表者らが蓄積してきたデータとの比較がしやすいことから、まずはこのアッセイ条件を選定した。

まず、A 環 2 位にカルボキシ基を有する誘導体、及びそのメチルエステルの結合能を検討したところ、いずれも (1) と同等または幾分弱い親和性を示した。一方、2 位炭素鎖を 1 つ伸長した側鎖末端にカルボキシ基を有する誘導体は、(1) の 10 倍の親和性を示し、構造内のカルボキシ基が 1 位ヒドロキシ基の代替としてはたらくことが示された。さらに、この効果はメチルエステル化することにより約 7 分の 1 に減弱したことから、カルボキシレートイオン等の関与が示唆された。

胆汁酸成分のひとつであるリトコール酸 (3) は、弱いながらも VDR の内在性リガンドとなる可能性が示されている。(3) は側鎖部 24 位にカルボキシ基を有することから、24 位カルボキシ基が 1 位ヒドロキシ基の代替として認識されるのではないかと当研究代表者らは考えていた。生理学的条件下ではプロトン化していると考えられるアルギニン残基のグアニジニウム塩の正電荷と、カルボキシル基の負電荷がより強い相互作用をするため、セコステロイド構造でないリトコール酸 (3) の不利な点を埋めると考えたためである。ただし、今回の結合能試験においては、リトコール酸 (3) のウシ胸腺 VDR 結合能は非常に低く、(1) と比べても弱い結果となった。

さらに、2 位にスピロオキセタン構造を有する 4 種の新規 VDR リガンドについては、2 位に *gem*-ジメチル基を有する誘導体との比較により、その親和性を検討した。誘導体 4 種のうち、天然型の立体配置を有する 1 位、及び 3 位ヒドロキシ基が最も高い親和性を示し、対応する *gem*-ジメチル基を有する誘導体に比べ、1.5 倍程度高い結果となった。また、1 位ヒドロキシ基は置換の 2 種が置換の 2 種よりも高い親和性を示した。一方、他の誘導体のうち、1 位、及び 3 位ヒドロキシ基を有する誘導体はこれまでの研究では最も親和性の低い立体配置と位置づけであったが、今回の研究結果では、低いながら VDR への親和性を保持していることが明らかとなった。2 位に導入したスピロオキセタン構造が 1 位ヒドロキシ基の代替として、アルギニン残基と相互作用する可能性が示さ

れた。

4. 研究成果

本研究において、VDR の LBD に存在する重要なアミノ酸残基であるアルギニンを指向する官能基として、カルボキシ基を有する新規リガンドを創製した。天然リガンドが利用する 1 位ヒドロキシ基に比較し、近傍 2 位に導入したアルキル側鎖末端のカルボキシ基がその代替としてはたらくことを見いだした。天然リガンドの持つ高い親和性に比較すると減弱されているが、さらに置換基の位置、側鎖長を検討することによってより活性の高い誘導体への展開が可能と考える。

さらに、2 位にスピロオキセタン構造を導入した 4 種の誘導体を合成し、*gem*-ジメチル置換基との比較により、有利な構造を取ることが明らかとなった。これまできわめて弱い活性であるとの認識であった 1 位、及び 3 位ヒドロキシ基を有する誘導体に関し、2 位オキセタンが 1 位ヒドロキシ基の代替としてアルギニン残基と相互作用する可能性が示された。

この研究において確立した A 環部合成法は望みの位置に望みの官能基導入が可能となる汎用性の高い合成法であり、今後の誘導体研究に大きく寄与するものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Toshie Fujishima, Tsutomu Suenaga, Takato Nozaki, "Concise synthesis and characterization of novel *seco*-steroids bearing a spiro-oxetane instead of a metabolically labile C3-hydroxy group", *Tetrahedron Lett.*, **2014**, in press

DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.05.060

Toshie Fujishima, Takato Nozaki, Tsutomu Suenaga, "Design and synthesis of novel 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogues having a spiro-oxetane fused at the C2 position in the A-ring", *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 5209-5217

DOI: 10.1016/j.bmc.2013.06.032

[学会発表](計 5 件)

末長努, 藤島利江, 「A 環にスピロオキセタン構造を有する活性型ビタミン D₃ 誘導体の合成」**2014**, 日本薬学会第 134 年会
藤島利江, 末長努, 山菅真基, 大西翔太, 川幡正俊, 山口健太郎, 「20-ヒドロキシビタミン D₃ 誘導体の合成研究」**2013**, 日本ビタミン学会第 65 回大会

藤島利江, 野崎孝徒, 「2 位にオキセタンを有する活性型ビタミン D₃ 誘導体の合成と生物活性」2013, 日本薬学会第 133 年会
藤島利江, 白石敏幸, 末長努, 「25-ヒドロキシビタミン D 誘導体のデザインと合成」2012, 第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム

Toshie Fujishima, Toshiyuki Shiraishi, Tsutomu Suenaga, “ Novel vitamin D receptor ligands having a carboxyl group as a possible anchor to the crucial arginine residue in the ligand-binding domain ”, 2011 ,The 8th AFMC international medicinal chemistry symposium

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤島 利江 (FUJISHIMA, Toshie)
徳島文理大学・香川薬学部・准教授
研究者番号：90286980